



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Patentschrift
10 DE 195 16 179 C 1

21 Aktenzeichen: 195 16 179.3-52
22 Anmeldetag: 3. 5. 95
23 Offenlegungstag: —
25 Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 21. 11. 96

51 Int. Cl.⁶:
G 01 N 30/00
G 01 N 1/10
G 01 N 31/22
G 01 N 33/53
C 12 Q 1/24
C 12 Q 1/70
C 12 Q 1/68
C 12 M 1/26
G 01 N 1/22

DE 195 16 179 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

73 Patentinhaber:
Cammann, Karl, Prof. Dr., 48155 Münster, DE

72 Erfinder:
gleich Patentinhaber

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:
NICHTS ERMITTELT

54 Chemisch-analytische Probenahme-Vorrichtung mit integrierter Dosimeter- und Funktionsanzeige

57 Die Erfindung richtet sich auf eine Probenahme-Vorrichtung und ein Verfahren zum selektiven Sammeln, Anreichern und Abtrennen der zu bestimmenden Stoffe und/oder biologischer Systeme (Analyte) von der betreffenden Probe-Matrix, das zusätzlich zu einer aktuellen Funktionsanzeige des Beladungszustandes eine Quantifizierung des Analyten nach dosimeter-ähnlichen Prinzipien ermöglicht. Dies wird erfindungsgemäß durch besonders analyt-selektive Sammelphasen auf Rezeptor-Basis erreicht, deren Analyt-Bindungsstellen jedoch vor jedem Einsatz mit einer leicht feststellbaren sog. Indikationssubstanz abgesättigt sind. Letztere wird durch die zu sammelnden Analyte aus den Bindungsstellen des Rezeptors verdrängt, was bei stark gefärbten oder fluoreszierenden Labeln der Indikationsverbindungen sofort mit bloßen Augen erkennbar ist, bei anderen mittels interner oder externer Sensoren leicht feststellbar ist. Diese neuartige Kombination von Probenahme-Vorrichtung und Dosimeter weist gegenüber den bisherigen Probenahme-Vorrichtungen wegen des Erkennens von Analyt-Durchbrüchen erhebliche Vorteile auf, die besonders bei Spurenanalysen oder der Analyse auf extrem gefährliche Substanzen augenfällig werden.

DE 195 16 179 C 1

BEST AVAILABLE COPY

Beschreibung

Die Erfindung richtet sich auf eine Probenahme-Vorrichtung und ein Verfahren zum Sammeln, Anreichern und Abtrennen der zu bestimmenden Stoffe oder komplexen biologischen und nicht-biologischen Systeme (= Analyte) von der Probenmatrix, die auf eine neuartige Weise gleichzeitig eine Funktionsprüfung verbunden mit einer Quantifizierung der zu bestimmenden Substanz(en) (Analyte) ermöglicht.

Die Nachfrage nach quantitativen Analysen komplexer Stoffgemische ist in den Bereichen Umweltanalytik und in der medizinischen Diagnostik wegen eines gestiegenen Umweltbewußtseins und großen Interesses an einer raschen und zuverlässigen medizinischen Diagnostik und Vorsorge stark angestiegen. Im Bereich der Umweltanalytik, aber auch auf dem Gebiet der biologischen und medizinischen Analytik wird die Qualität einer chemischen Analyse entscheidend von der Qualität der Probenahme und der Probenvorbereitung im Labor geprägt. Vor allem auf dem Gebiet der Spurenanalyse müssen die Analyte, je nach der Nachweisgrenze der jeweils verwendeten Analysemethoden, in vielen Fällen vor der eigentlichen chemisch-analytischen Bestimmung noch angereichert oder aufkonzentriert werden. Bei diesem Vorgang sollten aber die nicht zu bestimmenden (analysierenden) Bestandteile einer Probe (= Probenmatrix) nicht mit angereichert werden, da sie dann u. U. die eigentliche chemisch-analytische Bestimmung der Analyte wegen einer nicht mehr ausreichenden Selektivität der betreffenden Bestimmungsmethode stören können. Daher ist eine einfache Aufkonzentrierung durch beispielsweise Verdampfen (Einrotieren im Rotationsverdampfer) des Lösungsmittels oder Auflösen der gesamten Gasprobe in einer kleinen Lösungsmittelmenge (im Sinne einer Gaswäsche) nicht die optimale Lösung.

Optimal ist, wenn die Anreicherung auch mit einer Abtrennung von unerwünschten Probenbestandteilen verbunden ist. Für eine chemische Analyse von gasförmigen oder flüssigen Proben haben sich daher verschiedene Probenahmetechniken bewährt.

Bei gasförmigen Proben versucht man eine Anreicherung der Analyte verbunden mit einer gleichzeitigen Abtrennung von der Hauptgasmenge dadurch zu erzielen, daß man (wie in vielen DIN Methoden beschrieben) das Probergas durch mit einem speziellen Ab- oder Adsorptionsmittel gefüllte Sammelröhrchen leitet, daß die Analyte mit oder ohne eine chemische Veränderung (Abfangreaktion) bevorzugt zurückhält und die Probenmatrix ohne quantitative Ab- oder Adsorption oder chromatographischer Verzögerung passieren läßt. Zur eigentlichen chemischen Analyse werden die so aufkonzentrierten und mehr oder weniger von der Matrix befreiten Analytmoleküle mittels geeigneter Maßnahmen von der betreffenden Sammelphase heruntergespült, wozu für diese Elution minimale Mengen von Gas oder Flüssigkeit Anwendung finden sollen.

Die bekannten Gas-Sammelröhrchen sind dazu, ähnlich wie im Falle einer gefüllten Chromatographie-Säule mit einer sog. stationären Phase gefüllt, die die zu bestimmenden Stoffe (Analyte) besonders effektiv binden. Dazu werden dem derzeitigen Stand der Technik entsprechend, bevorzugt Adsorptions- (Grundlage: Adsorptionsisothermen) oder Absorptionskräfte (Grundlage: Nernstscher Verteilungssatz) ausgenutzt. Beide Effekte sind leider nicht molekül- und damit analyt-spezifisch sondern wirken bevorzugt über die bekannten

schwachen Wechselwirkungskräfte (van der Waals, Dipol-Dipol, hydrophobe Wechselwirkungen, etc.), die z. B. durch die Polarität eines Moleküls vorgegeben sind.

Bei gasförmigen Proben verwendet man dazu vorzugsweise die bekannten stationären Phasen der Gaschromatographie, die für die Analyte ein besonders ausgeprägtes Bindungsvermögen aufweisen, während die Probenmatrix-Bestandteile nur schwach gebunden werden. Eine mehr oder weniger analytselektive Bindung und damit quantitative Trennung von der Matrix kommt aber leider durch diese Adsorptions- oder Absorptionskräfte (zwischen einer Gasphase und einem dünnen Flüssigkeitsfilm — analog wie bei den betreffenden Chromatographie-Arten) nicht zustande. Nach dem Stand der Technik werden in diesen Sammelröhrchen oder Behältern (Waschflaschen, Impinger oder dergl.) entweder gut adsorbierende Stoffe, wie Aktivkohle, Silicagel, Aluminiumoxid, Mg-Silikate (Florasil), Zeolithe, Molekularsiebe o. ä. verwendet. Die Desorption der Analyte zur nachfolgenden Analyse erfolgt dann vorzugsweise bei erhöhter Temperatur (Thermodesorption). Eluens kann ein Gas oder auch eine Flüssigkeit mit guter Löslichkeit für die Analytmoleküle sein.

Bei flüssigen Proben nutzt man bevorzugt Verteilungsgleichgewichte aus. Daher werden hier die entsprechenden, typischen stationären Phasen aus der Verteilungschromatographie (vergleiche: Autorenkollektiv (1981), Analytikum, VEB Deutscher Verlag für die Grundstoffindustrie, Leipzig), wie z. B. Carbowax 300, Squalan, Apizon, SE 30, SE 52, OV 17 oder auch bevorzugt das hochpolymere Tenax u. a. eingesetzt, die als dünner Flüssigkeitsfilm auf einem inerten, gekörnten Trägermaterial aufgezogen sind. Letzteres befindet sich als Sammelphase in der betreffenden Sammelvorrichtung.

Die Auswahl des für den Analyten am besten geeigneten Flüssigkeitsfilms und die Wahl des geeignetsten Elutionsmittels richtet sich nach dem sog. chromatographischen Dreieck, das dem Fachmann geläufig ist. Hier wird zunächst die Auswahl der stationären Sammelphase anhand maximaler Wechselwirkungskräfte (polare Analyte benötigen polare Sammelphase, unpolare entsprechend unpolare Phasen) getroffen.

Bei der Probenahme von flüssigen Proben hat sich anstelle einer Extraktion mit geeigneten Lösungsmitteln, die nachher zwecks Aufkonzentrierung wieder eingengt und entsorgt werden müssen, in den letzten Jahren die sog. Festphasen-Extraktion (Solid Phase Extraction, SPE) an festen, stationären Phasen, die der Flüssigchromatographie entliehen sind, zur Anreicherung und Zurückhaltung der Analyte und einer Matrix-Abtrennung sehr bewährt. Bei dem entsprechenden Sammeln von Analyten aus flüssigen Proben beruht die erfolgreichste Technik der sog. Festphasen-Extraktion auf einer Verteilung eines vorzugsweise lipophilen Analyten in einer entsprechenden Phase niedriger Polarität. Besonders geeignet zum Sammeln und Auftrennen wenig polarer Analytmoleküle sind sog. beispielsweise Reversed-Phase (RP)-Füllmaterialien (z. B. RP-12 oder RP-18).

Sowohl die Probenahme von Gasen als auch die von flüssigen Proben läßt sich aber erfindungsgemäß in Anlehnung an die Affinitäts-Chromatographie besonders vorteilhaft gestalten. Die Idee der vorliegenden Erfindung ist, daß man als Analyt-Sammelphase analytspezifische oder mindestens -selektive Rezeptoren (biologischer oder nichtbiologischer Art oder Herkunft) ver-

wendet. Als selektiv analyt-bindende Rezeptoren sind alle Substanzen geeignet, die analog dem Prinzip der Antigen (= Analyt) – Antikörper Wechselwirkung (Schlüssel-Schloß-Prinzip oder "Induced-Fit" Handschuh-Prinzip) substanzerkennende Eigenschaften haben. Derzeit sind dazu weiter geeignet und auch bekannt: Antigen-Antikörper-Fragmente, DNA-komplementäre DNA (Prinzip der DNA-Sonden) oder analoge Systeme auf RNA Basis, Gast-Wirtsmoleküle der sog. supramolekularen Chemie, oder stationäre Trägermaterialien, in deren Oberfläche das oder die zu sammelnden Analyt-Molekülformen nach der sog. "Molecular Imprinting" Technik "eingeformt" wurden, so daß dabei die jeweils zur Analyt-Molekülform komplementäre Form dort als Vertiefungen (Abdruck) auftreten.

Wegen der überaus großen Spezifität und sehr starken und selektiven Bindung von Analytmolekülen (z. B. Affinitätskonstante ca. $> 10^{10}$), erlaubt die Verwendung von analytmolekül-spezifischen Rezeptoren als Sammelphase wesentlich bessere Analyt-Isolierungen und -Anreicherungen als alle anderen, bekannten Verfahren.

Bei der Sammlung aus gasförmigen Proben muß allerdings bei Verwendung biologischer Rezeptoren (Antikörper, Antikörper-Fragmente, DNA, RNA oder dergl.) eine gewisse Feuchtigkeit vorhanden sein, damit die Funktionsfähigkeit der betreffenden Proteinmoleküle (Tertiär- und Quartär-Struktur) zur selektiven Analyt-Anbindung erhalten bleibt; daher ist in solchen Fällen eine Gaswäsche mit einer wäßrigen oder partiell wäßrigen Pufferlösung vorzuschalten. Bei flüssigen Proben braucht nur ein bestimmter pH-Wert und eine bestimmte Ionenstärke eingehalten werden, damit die Proteinstruktur nicht denaturiert und damit die spezifische Analytbindungseigenschaft verloren geht.

In allen Fällen, d. h. sowohl bei den erstgenannten Sammelmateriale auf Basis der Adsorption oder Absorption (Verteilung) wie auch bei den Sammelmateriale auf Analyt-Rezeptor-Basis ist aber der jeweils aktuelle Beladungszustand (Grad der Absättigung mit Analytmolekülen) der betreffenden Sammelvorrichtung und damit auch das sog. Analyt-Durchbruchsvolumen (verlustbringender, unkontrollierter Austritt aus der betreffenden Sammelvorrichtung wegen Überladung) der so gesammelten Probe zunächst unbekannt. Man muß zur Ermittlung dieses Probevolumens die maximal von der Sammelvorrichtung zurückgehaltene Analytmenge jeweils für jede Sammelvorrichtung einzeln ermitteln. Dies geschieht i.d.R. empirisch aus Versuchen mit synthetischen Standards. So erhält der Fachmann analytkonzentrations-abhängige, maximale Probenvolumina, bei denen der Analyt oder die Analyte noch zu 100% in der Sammel- und Trennvorrichtung zurückgehalten werden.

Es ist im Sinne einer richtigen Spurenanalytik von zentraler Bedeutung, daß bei der Sammlung, Anreicherung und Matrix-Abtrennung des oder der Analyte eine Wiederfindungsrate von 100% vorliegt. Das Durchbruchsvolumen kennzeichnet jene Probenmenge (Volumen an Probegas oder -flüssigkeit), die in einer vorgegebenen Zeit durch die Sammelvorrichtung geleitet werden dürfen, bevor die ersten Analytmoleküle wieder aus der Sammelvorrichtung austreten und daher für eine spätere Quantifizierung nicht mehr zur Verfügung stehen. Dies zieht Minderbefunde nach sich.

Das Durchbruchsvolumen ist aber zusätzlich auch von der Probenmatrix abhängig. Liegen mehr ähnlich gebaute Moleküle wie das Analytmolekül (oder -ion) in der Probenmatrix vor, so wird beispielsweise das

Durchbruchsvolumen entscheidend verkleinert, weil die Sammelphase nur eine bestimmte, endliche Kapazität hat. Ähnlich können bei flüssigen Proben auch oberflächenaktive Substanzen in der Matrix wirken. Eine Erwärmung wirkt ebenfalls vermindern auf das Durchbruchsvolumen. Wegen dieser starken Abhängigkeiten von der individuellen Matrix der betreffenden Probe und der Sammelbedingungen, werden von erfahrenen Fachmännern i.d.R. besondere Vorsichtsmaßnahmen ergriffen, um einen Durchbruch (= Austritt aus der Sammel-Vorrichtung noch während der Sammelphase) des oder der Analyte zu verhindern bzw. auszuschließen.

Zur Verhinderung einer sog. Überladung der Sammelphase in der jeweiligen Sammelvorrichtung und damit eines Durchbruchs des oder der Analyten und damit eines Verlustes schaltet man mindestens ein zweites Gas- oder Flüssigkeits-Sammelröhrchen hinter dem ersten und bestimmt auch in dieser und allen weiteren so in Serie geschalteten Sammelvorrichtungen den oder die Analyte und addiert diese Gehalte zu dem Wert, die mit dem Haupt-Sammel-System erhalten wurde.

Nach der Sammel- und Abtrennphase mit Anreicherung des oder der Analyten in der Sammelvorrichtung (Waschflaschen, Röhren, Kartuschen, Kapillaren o. ä.) wird bei gasförmigen Proben entweder der oder die Analyte durch Temperaturerhöhung (Thermodesorption) oder durch eine Extraktion mit wenig Lösungsmittel aus der Sammel-Vorrichtung gebracht und eine abgemessene Menge chemisch analysiert. Bei der Festphasen-Extraktion von flüssigen Proben, wird das den Analyten am besten eluierende Lösungsmittel durch die Sammel-Vorrichtung geleitet und den oder die Analyte so der eigentlichen Analyse zugeführt. In beiden Fällen ist natürlich die insgesamt durch die Sammelvorrichtung geflossene Probenmenge bekannt.

Da sowohl bei der oben erwähnten Gasprobennahme-Methode wie auch bei der für Flüssigkeiten, jegliche Überladung zu fehlerhaften Analysen führt, besteht das Problem letztere zu erkennen, um sicher zu gehen. Bei stark schwankenden Analyt-Konzentrationen und variierender Matrix, Temperatur und Probe-Sammelgeschwindigkeit können selbst die Hintereinanderreihung mehrerer Sammelvorrichtungen nicht mehr ausreichen. Großer Nachteil der letztgenannten, bisher ausschließlich praktizierten Methode ist der entsprechend vervielfachte Arbeitsaufwand und die starke Widerstandserhöhung für den Probenfluß durch mehrere hintereinandergeschaltete Vorrichtungen. Da die eigentliche Sammelzone aus Gründen kurzer Diffusionswege der Analyte zu entsprechenden Bindungsstellen auf der Oberfläche des meist pulverförmigen Sammelmateriale relativ dicht gepackt (geschüttet) ist, wirkt diese Zone als starkes Strömungshindernis, d. h. es können sich dort, je nach Korngröße des Füll-, Träger- und Sammelmateriale, beträchtliche Druckverluste aufbauen.

Da man aber aus Gründen des Anschließens von Einschleppungen von Verunreinigungen die Probenabnahme-pumpe flußmäßig stets hinter den Sammelvorrichtungen platziert (Ansaugen der Proben), können so leicht Grenzen des Probendurchsatzes erreicht werden. Eine ist beispielsweise die, daß für eine vernünftige Probenabnahmegeschwindigkeit ein derartig hohes Vakuum hinter der Sammelvorrichtung erzeugt werden muß, daß die betreffende Probenflüssigkeit zu sieden beginnt. Bei den proteinchemischen Sammelphasen auf Basis analytspezifischer biologischer Rezeptoren mit entsprechenden Analyt-Bindungsstellen kann das Problem der Protein-Denaturierung durch die verschiedensten Ursa-

chen (Temperatur, Druck, pH-Wert, Ionenstärke, chaotrope Matrix, Schwermetalle o.a. Gifte, etc.) auftreten und zum Versagen der Sammelvorrichtung führen, ohne daß andere, äußere Anzeichen darauf hindeuten. Ein denaturiertes Protein hat alle Antigen (=Analyt)-bindenden Eigenschaften verloren, d. h. es liegt eine verfügbare Sammelkapazität von Null vor. Die betreffende Sammelvorrichtung ist dadurch zur Probenahme ungeeignet geworden.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es auch, eine verbesserte Probenahme- und Sammelvorrichtung und ein damit auszuführendes Verfahren zu schaffen, das in der Lage ist, den jeweils aktuellen Analyt-Beladungs(-belegungs) Zustand zu erfassen und eine einfache, automatische Funktionsüberprüfung einer Sammelvorrichtung für gasförmige und flüssige Proben zu ermöglichen, wobei gleichzeitig im Sinne einer qualitätssteigernden Probenahmetechnik darüber hinaus damit auch noch eine vorprobenartige Analyt-Quantifizierung durchgeführt werden kann.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß die betreffenden, für den oder die Analyte optimale stationäre Sammelphase nicht — wie üblich — unbelegt, also mit freien Ad- oder Absorptionsplätzen, sondern erfindungsgemäß bereits mit einer allerdings schwächer ad- oder absorbierten oder rezeptor-gebundenen Verbindung (hier: Verdrängungssubstanz oder Indikationsverbindung oder -substanz genannt) belegt (gesättigt mit dieser zu verdrängenden Substanz) benutzt wird. Die von den zu sammelnden Analyten leicht zu ersetzende Verdrängungssubstanz/Indikationsverbindung ist erfindungsgemäß geeignet markiert, so daß man anhand einer möglichst einfachen zu erkennenden Markierungszone oder eines Integralsignals eines kleinen, nachgeschalteten, auf die durch den oder die Analyten verdrängte, markierte Substanz ansprechenden Durchflußdetektors (oder interner und/oder externer Sensoren leicht feststellen kann, ob die zu sammelnden Analyte diesen Markierungsstoff bzw. diese Indikationsverbindung) schon vollständig aus dem aktiven Sammelphasenbereich der Vorrichtung verdrängt haben oder nicht, was einem zu vermeidenden Durchbruch mit den bekannten Nachteilen gleich käme. Das Integralsignal stellt die Aufsummierung aller Detektor-(Sensor)signale dar und entspricht der bekannten Gesamtmenge an Indikationsverbindung, die bis zum Zeitpunkt durch die Analyte verdrängt wurde. Da die Gesamt-Kapazität der Sammelphase an Analyt-Bindungsstellen bekannt ist, läßt sich so jede restliche Sammelkapazität ermitteln.

Die durch den Analyten zu verdrängende Indikationsverbindung besteht i.d.R. aus einem analytähnlichen Bindungsmolekül mit schlechterer Anbindung an die Sammelphase als das oder die Analytmoleküle, welches aber zusätzlich kovalent mit einer geeigneten Markierung versehen ist oder eine intrinsisch enthält.

Die Art der Markierung dieser Indikationssubstanz ist erfindungsgemäß unerheblich. Besonders vorteilhaft sind allerdings solche, die mit bloßen Augen und/oder minimalen Hilfsmitteln, z. B. mittels einfacher interner oder externer Sensoren feststellbar sind.

Die Auswahl der optimal geeigneten markierten Verbindung, die im Verlauf der Probenahme durch die Analytmoleküle zu verdrängen ist, erfolgt bei den chromatographischen Sammelmaterialien anhand des chromatographischen Dreiecks, indem als zu verdrängendes Molekül eine Grundsubstanz verwendet wird, die unter den gegebenen Bedingungen kaum oder sehr schlecht auf einer entsprechenden adsorptions- oder verteilungs-

chromatographischen Säule zurückgehalten wird. Handelt es sich beispielsweise bei der anzureichernden und zu sammelnden Analytmolekülsorte um eine besonders lipophile Verbindung, die bevorzugt von einer RP-Phase festgehalten werden, so muß die markierte Verdrängungssubstanz weniger lipophil sein, was durch einen um den Faktor > 10 unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten ausgedrückt werden kann. In diesem Fall ist die Oberfläche der Sammelphase ebenfalls lipophil (z. B. RP-18 Phase). Handelt es sich beispielsweise beim Analyten um eine hydrophile, polare Verbindung, so wird bevorzugt eine polare Sammelphasenoberfläche zur Anreicherung und Abtrennung des Analyten gewählt und eine weniger polare Markierungssubstanz zusammen mit einem ebenfalls weniger polaren Lösungsmittel verwendet.

Bei den neuartigen Sammelmaterialien auf Analyt-Rezeptor-Basis (z. B. immunchemische Bindung mittels Antikörper oder analytbindende Antikörperfragmente sowie Molecular-Imprinting Technik) eignet sich erfindungsgemäß das Analyt-Molekül selbst, wenn es beispielsweise kovalent an molekülmäßig größere Markierungsatomgruppen (konjugierte Molekülgruppe mit geeigneten optischen, elektrochemischen oder anderen, zur Markierung geeigneten Eigenschaften) gebunden ist. In diesem Fall führt die sterische Hinderung des so markierten Analyt-Moleküls zu einer kleineren Affinitätskonstante, was der erfindungsgemäß beabsichtigten, weniger festen Anbindung (oder Assoziation) an die Rezeptorphase entspricht.

Als geeignete Markierungsmoleküle oder -atomgruppen haben sich in vielen eigenen Versuchsläufen besonders bewährt: stabile Farbstoff-Moleküle mit besonders hohen, molekularen Extinktionskoeffizienten, fluoreszierende Moleküle mit starker Emissions-Intensität im sichtbaren Bereich des Spektrums, Redox-Systeme auf Basis von Molekülen oder Ionen mit besonders hoher Standard-Austauschstromdichte, weiterhin: elektrochemisch aktive (leicht ohne hohe Überspannung reduzier- oder oxidierbare Moleküle) sowie bestimmte Ionophore, Enzyme, massenerhöhende Gruppen, DNA/RNA-Label oder dergl., wie sie von den Immuno-Assays oder DNA-Sonden her bekannt sind.

Bei molekülmäßig zu kleinen Markierungsgruppen, die bei kovalenter Anbindung an das Analyt-Molekül die Affinitätskonstante zu wenig erniedrigen, so daß diese Indikationsverbindung zu schlecht von den Analyten verdrängt wird, kann man erfindungsgemäß auch ein dem Analytmolekül ähnliches mit einem zum betreffenden Rezeptormolekül passenden Epitop nehmen, wenn diese markierte Verbindung dann eine hinreichend schwächere Bindung mit der Bindungsstelle des betreffenden Rezeptors eingeht. Hinreichend bedeutet erfindungsgemäß eine um den Faktor mindestens 2 kleinere Affinitätskonstante.

Bei den Sammelmaterialien auf Analyt-Rezeptor-Basis ist die Art des inerten Trägermaterials für die analyt-erkennenden Rezeptormoleküle unerheblich. Wichtig ist nur, daß das betreffende Trägermaterial packungsmäßig in den meist säulenartigen Sammelvorrichtung nicht zu einem zu hohen Druckverlust führt.

Erfindungsgemäß kann man die Kapazität des Sammelraumes auch durch eine Kaskadenanordnung von mit entsprechenden, analytfangenden Rezeptormolekülen beladenen Filterpapieren oder probedurchlässigen Kunststoff-Folien mit entsprechenden größeren Durchmessern erhöhen. Stand der Technik auf dem Gebiet der inerten Trägermaterialien für biologische und nicht-bio-

logische Rezeptoren sind poröse, druckstabile Träger (z. B. controlled pore glass, CPG, Kunststoff-Partikel oder solche auf anorganischer Basis, wie Silicagel o. ä.).

Wesentlich geringere Druckverluste treten in einer erfindungsgemäß mit einem aufgerollten planaren Träger (z. B. Filterpapier, Dialysierfolien, Cellophan- oder Kunststoffmembranen) gefüllten Probesammelvorrichtung auf.

Hier können die analyt-selektiven Rezeptormoleküle auf beiden Seiten des Trägers, der durch Abstandsvorrichtungen mit definierten Zwischenräumen operiert, immobilisiert werden. Entsprechende Anordnungen kennt der Fachmann aus dem Gebiet der Entsalzungsanlagen auf Basis der Umkehrosmose oder der Elektrodialyse. Durch die dadurch gegebenen kurzen Diffusionsstrecken der Analyt-Moleküle zu den betreffenden Bindungsstellen der Rezeptoren wird die Kinetik der Anbindung der Analyt-Moleküle an die betreffenden Bindungsstellen sehr beschleunigt.

Desweiteren können erfindungsgemäß als Sammelvorrichtung umfunktionierte dialysierschlauch-ähnliche Anordnungen (z. B. aus der Blutwäsche bei Nierenkranken stammend) benutzt werden, wenn die mit der Probe in Kontakt kommenden Oberflächen mit immobilisierten, analyt-bindenden Rezeptoren überzogen sind. Eine solche Anordnung kann beispielsweise weit über 100 rezeptorbeladene Schläuche mit Einzeldurchmessern unter einem Millimeter und Längen von über 10 cm enthalten. Die Probeströmung kann sowohl durch die Schläuche als auch um die Schläuche herum wie auch beim Vorliegen geeigneter Strömungs-Charakteristiken beides zusammen erfolgen. Wichtig ist eine Längsanströmung. Durch eine solche vorteilhafte Anordnung der Sammelphase wird eine große Beladungskapazität bei einem sehr geringen Druckverlust erreicht. Vorteilhafte Ausführungsformen bestehen aus durchsichtigen Materialien und lassen die zur einfachen optischen Erkennung notwendigen Wellenlängen durchtreten, was ein einfaches Erkennen des Beladungszustandes mit dem bloßen Auge ermöglicht. Die jeweils andere Oberfläche der Schläuche, die nicht mit der Probe in Kontakt ist, kann bei der Verwendung von Dialyserschläuchen ggfs. auch noch mit einer Lösung höherer Osmolarität gespült werden, so daß die zu sammelnden Analyt-Moleküle zusätzlich auch noch durch eine Strömung der Lösungsmittel-Moleküle in die Nähe der Bindungsstellen der Rezeptoren getrieben werden. Müssen niedermolekulare Analyte von hochmolekularen getrennt werden, dann werden die analytbindenden Rezeptoren vorteilhafterweise auf jener Seite der Dialysmembran immobilisiert, die nicht mit der Probe in Kontakt steht, weil so bei einem richtig gewählten molekularen Cut-off hierbei eine doppelt wirkende Abtrennung erzielt wird. Diese Probenahmetechnik ist besonders zu Gewinnung von Analyten aus biologischen oder medizinischen Proben geeignet.

Die richtige Orientierung der analytkennenden Rezeptormoleküle ist die, bei der die spezifische Analyt-Bindungstellen von der inerten Trägeroberfläche weg zeigt, da dann eine rasche und ungehinderte Bindung des zu sammelnden Analyten eintritt und so auch eine optimale Bindungsstellen-Dichte gegeben ist. Dazu werden in der Literatur zahlreiche Methoden beschrieben, die hier nicht Gegenstand der Erfindung und dem Fachmann geläufig sind.

Die rezeptorbelegten Sammel- und Kollektorphasen für die betreffenden Analyt-Moleküle werden beim erfindungsgemäßen Verfahren vor jedem neuen Einsatz

der Analyt-Sammel- und Abtrennvorrichtung mit der Indikationsverbindung abgesättigt (überschußvermeidend beladen). Der Beladungsvorgang ist entweder an der direkten oder indirekten (z. B. Bestrahlen mit Licht geeigneter Wellenlänge bei Fluoreszenzmarkern), sichtbaren Anfärbung der Sammelzone oder bei undurchsichtigen Sammelvorrichtungen und/oder anderer Markierung durch den Durchbruch dieser Indikationsverbindung in den Durchflußdetektor feststellbar. Ebenso ist detektormäßig das Auswaschen eines Überschusses verfolgbar.

Da die so markierten Indikationssubstanzen im Laufe einer Probenahme sukzessive durch die sich anders verhaltenen Analyt-Moleküle aus der betreffenden Sammelzone verdrängt werden, ergibt sich so erfindungsgemäß eine einfache und sofortige Kontrollmöglichkeit der jeweils noch vorhandenen Beladungskapazität der Probenahme- oder -Sammelvorrichtung. Damit wird ein bestehendes Problem der Spurenanalyse komplexer Proben besonders effektiv gelöst.

Bei konstanter und reproduzierbarer Packungsdichte der aktiven Sammelzone ergibt sich erfindungsgemäß vorzugsweise bei den besonders selektiv wirkenden Sammelmaterialien auf Rezeptor-Basis durch einfaches Abmessen der durch die zu sammelnden Analyt-Moleküle veränderten Markierungszone (Strecke) nach entsprechender Kalibrierung zusätzlich auch noch ein quantitativer Hinweis, der als Vorprobe dienen kann. Dieses Dosimeter-Verfahren kann darüberhinaus auch vorteilhaft zur Ermittlung der für die nachfolgende analytische Bestimmung optimalen Analytkonzentration herangezogen werden, was überflüssige, zusätzliche Bestimmungen erspart. Gleichzeitig wird durch die dadurch gegebene Redundanz der Ergebnisse die Zuverlässigkeit der betreffenden Analyse gesteigert.

Bei der erfindungsgemäß möglichen Verwendung von geeigneten Rezeptoren, die selektiv bestimmte Substanzklassen binden, ergibt sich darüber hinaus mittels einer derartigen neuen Sammelvorrichtung eine neue und besonders einfache und schnelle Methode zur zuverlässigen Bestimmung einer Vielzahl von entsprechenden Summenparametern. Es versteht sich für einen Fachmann von selbst, daß eine solche Sammelvorrichtung, die erfindungsgemäß mit einer auch als Dosimeter dienenden Zustandsanzeige kombiniert ist, in den verschiedensten Einheiten, wie beispielsweise Masse oder Molarität kalibrierbar ist.

Die vorliegende Erfindung vereinigt dadurch die bekannten Techniken der Analyt-Anreicherung und Matrixabtrennung bei gasförmigen und flüssigen Proben mit einer neuen Technik der quantitativen Prüfröhrchen Analyse auf Analyt-Rezeptor-Basis.

Im Fall eines Sammelmechanismus auf chromatographischer Basis wird, nach dem derzeitigen Stand der Technik zu urteilen, keine Indikationssubstanz zur on-line Sichtkontrolle der Funktionsweise verwendet, die auch quantitative Abschätzungen der Analytkonzentration ermöglichen würde. Alle bisher in der Literatur beschriebenen Probesammelvorrichtungen schlagen die Hintereinanderschaltung derartiger Vorrichtungen zur Vermeidung von Analytverlusten vor. Ähnlich äußern sich auch alle standardisierten Verfahren (z. B. DIN-, EPA- u. a. Vorschriften).

Der Stand der Technik auf dem Gebiet der Prüfröhrchen oder Dosimeter ist bisher dadurch charakterisiert, daß mehr oder weniger selektive chemische Reaktionen des Analyten mit bestimmten Reagenzien ablaufen, die aber i.d.R. zu einer irreversiblen Veränderung des Ana-

lyten führen. Dadurch sind derartige Vorrichtungen zur Probenahme, Probenanreicherung und Abtrennung von Analyten weniger geeignet. Dosimeter auf dieser Grundlage sind seit langem im Einsatz und lassen sich id.R. nicht für weitere Messungen regenerieren.

Im Fall der erfindungsgemäßen Probenahmenvorrichtung auf Analyt-Rezeptor-Basis, werden die Analyt-Moleküle unverändert und reversibel an die Rezeptormoleküle gebunden oder assoziiert. Sie können danach durch bekannte, das Rezeptormolekül schonende Verfahren (pH-Wert Veränderung, chaotrope Reagenzien) wieder unverändert abgespalten und einer chemischen Analyse zugeführt werden. Charakteristisch für die vorliegende Erfindung ist daher auch die Reversibilität der Sammel-, Anreicherungs- und Abtrennmechanismen sowie die der Regenerierbarkeit der dadurch gegebenen Dosimeter.

Bekannt sind direkte on-line immunochemische Monitore auf der Grundlage der Verdrängung eines schwächer gebundenen fluoreszenz-markierten Antigens von einer affinitätschromatographischen Säule in Form einer entsprechenden Kartusche. Hier dient aber die Registrierung der aus der Kartusche austretenden fluoreszierenden Verbindung als direktes Analysensignal (Bestimmungssignal). In keinem Fall erfolgt die Quantifizierung durch das Abmessen einer Strecke der Sammelphase. Das optische Detektorsignal geht bei den dem Fachmann bekannten Assay-Verfahren bei Erschöpfung des "Immuno-Reaktors" gegen Null, was schwer von dem Zustand bei geringen Analytspuren zu unterscheiden ist. Demgegenüber bleibt in einem solchen Fall bei der vorliegenden Erfindung die markierte Zone in der Sammelvorrichtung nahezu unverändert. Es ist aber trotzdem noch der aktuelle Beladungszustand sofort ablesbar.

Bekannt sind auch weitere direkte Bestimmungstechniken in miniaturisierter Kit-Form, bei denen ein markiertes Reagenz-Antigen nach entsprechender Verdrängung durch das Analyt-Antigen in einen eng benachbarten Reaktionsraum eindiffundiert und dort beispielsweise mit Hilfe zusätzlicher Reagenzien eine empfindliche Chemolumineszenz erzeugt, die direkt gemessen wird. Diese und alle weiteren Verfahren zur direkten Anzeige und Quantifizierung niedermolekularer Moleküle stellen direkte Bestimmungsverfahren auf immunochemischer Basis (Immunoassays) und keine Probenahmetechniken, bzw. keine Kombination von Probenahme- mit Dosimetertechnik dar.

Die vorliegende Erfindung stellt in erster Linie eine optimierte und besonders vorteilhafte Probenvorbereitungstechnik dar, die die Sammlung der interessierenden Analyten mit ihrer Anreicherung und Abtrennung von der Probenmatrix verbindet und die die eigentliche hochgenaue Bestimmung des oder der Analyte mittels beliebiger Methoden gestattet. Dabei ist erfindungsgemäß die Art der Analyt-Anbindung durch sehr selektive immunochemische Bindungen oder mehr physikalisch-chemischer Adsorption oder Verteilung unerheblich. Wichtig ist erfindungsgemäß die Einfachheit der Markierung und ihre Feststellung und damit die zuverlässige Anzeige der jeweils (noch) vorhandenen Analyt-Sammelkapazität, die in vielen Fällen auch noch gleichzeitig als Dosimeter dienen kann.

Wegen der großen Vielzahl der Kombinationsmöglichkeiten von stationären Sammelphasen mit den unterschiedlichsten strömenden Phasen ermöglicht die Erfindung eine nicht naheliegende Erweiterung aller bisher beschriebenen Immuno-Assay Techniken. Die Erfin-

dung betrifft daher eine ideale Kombination von Probenahmetechniken mit Anreicherungs- und Abtrenntechniken, wobei je nach der vorher gewählten Selektivität der Sammelphase, nur ein einziger Analyt oder auch eine bestimmte Stoffklasse (Summenparameter-Bestimmung) gesammelt werden kann.

Die quantitative Gewinnung des so automatisch angereicherten und von der oft störenden Probenmatrix abgetrennten Analyten geschieht nach den bekannten Festphasenextraktionsmethoden, wobei die optische Verfolgung des Auswaschens des Restes der Indikationsverbindung die Extraktionseffektivität zu kontrollieren erlaubt; wenn sie nicht extrahiert wird, dann werden die gesammelten Analytmoleküle es erst recht nicht. Bei immunochemischen Methoden (affinitätskontrollierte Sammlung von einer Analytmolekülsorte oder mehrerer Sorten) werden die bekannten Techniken der schonenden Antikörper-Antigen-Dissoziation, wie beispielsweise die Eluasion mittels chaotroper Reagenzien (z. B. Harnstoff u. a.) oder einer sauren Pufferlösung (pH zwischen 1 bis 3) dazu verwendet. Die Menge an Eluationsmittel ist so zu bemessen, daß die Sammelphase dabei auch von der markierten Verbindung befreit wird.

Umfangreiche Tests im Vorfeld der Erfindung haben ergeben, daß gut (richtige Orientierung) immobilisierte Affinitätsphasen viele dieser Regenerationsschritte ohne wesentliche Einbuße an Funktionsfähigkeit überstehen. Sie können durch erneute Beladung unter optimalen Bindebedingungen (pH-Wert, Ionenstärke etc.) mit dem markierten, zu verdrängenden Antigen wieder beladen werden und zur nächsten Probenahme verwendet werden. Auch bei dieser Belegung mit der Indikationsverbindung (markierten Antigen) ist eine leicht sichtbare Markierung von besonderem Vorteil, denn man erkennt sofort den Beladungszustand und damit den Zeitpunkt, wenn keine überschüssige Markierungssubstanz beim Spülvorgang mehr aus der Sammelzone austritt.

Durch die freie Wahl einer optimalen Analysenmethode für den erfindungsgemäß abgetrennten und angereicherten Analyten, ergeben sich bezüglich der entscheidenden Analysen- und Bestimmungsmethode besonders vorteilhafte Freiheitsgrade, die zusätzlich wegen der Abtrennung störender Beimengungen zu besonders zuverlässigen und richtigen Analysenbefunden führen.

Ein Einsatz dieser selbstkontrollierenden Analyt-Sammel-Vorrichtung verbessert dadurch die Nachweisgrenzen und Richtigkeit von Spurenanalysen in gasförmigen und flüssigen Proben bei gleichzeitiger Vereinfachung und Zeitersparnis. Die Erfindung stellt dadurch eine entscheidende Weiterentwicklung aller bekannten, auf eine Verdrängungsreaktion basierender Bio- oder Immuno-Assays dar, die demgegenüber keinerlei Bestimmungsmethodenfreiheit aufweisen.

Dementsprechend löst die Erfindung mehrere Probleme der Spurenanalyse von gasförmigen und flüssigen Proben, die durch die bekannten Immuno-Assays und Prüfröhrtechniken allein nicht gelöst werden.

Mit der vorliegenden Erfindung werden die folgenden, besonders für die Spurenanalyse extrem bedeutsamen Vorteile erreicht:

a) Der aktuellen Beladungszustand der betreffenden Sammelvorrichtung kann sofort erkannt werden, d. h. neu und frisch kann von dem Zustand alt, gebraucht oder noch analyt-beladen oder mit anderen Stoffen abgesättigt, auf Anhieb unterschieden werden.

- b) Es ist erkennbar, ob in der Probematrix der zu analysierende Stoff überhaupt in nennenswerten Mengen vorhanden ist; denn wenn die Markierungszone sich nicht während des Durchleitens der Probe verändert, ist nichts vorhanden, was später zu analysieren wäre, was Analysenzeit, -kosten und Chemikalien-Abfall spart. Außerdem kann dadurch nahezu automatisch und in-situ und ohne Vorinformation über zu erwartende Analytkonzentrationen eine optimale Probenmenge gezogen werden.
- c) Nach einer geeigneten Kalibrierung kann aus dem Abschnitt, bei dem die Indikationssubstanz durch den Analyten verdrängt wurde, die bis dahin gesammelte Menge ermittelt werden (Prüfröhrchen-Prinzip).
- d) Es ist sofort feststellbar, wenn die Kapazität einer Probenahme-Vorrichtung dem Ende zugeht oder bereits überschritten wurde, was Analysenfehler verhindert.
- e) Es werden keine weiteren Probenahmeverrichtungen in Serie benötigt, um das Durchbrechen zu verhindern, was den Druckverlust in Grenzen hält und Arbeitszeit für die gesonderte Aufarbeitung erspart.
- f) Die Sammel- und Abtrennvorrichtungen sind weiter miniaturisierbar und benötigen aus Sicherheitsgründen nicht eine so lange Durchfluß-Strecke der Sammelphase sondern können wegen der Kontrollmöglichkeit mit vergrößerten, durchströmten Flächen arbeiten, was zu einem geringeren Druckverlust führt und weniger Pumpleistung erfordert.
- g) Bei der Gewinnung der so gesammelten Analyten durch Eluation der so gleichzeitig von der Probematrix abgetrennten Analyte ist die Menge an Eluationsmittel, die zur verlustlosen Auswaschung der gesamten, gesammelten Analytmenge notwendig ist, diejenige, die auch die noch vorliegende Menge der markierten Verbindung aus der Probenahmeverrichtung verdrängt. Dies verhindert eine überflüssige Verdünnung.
- h) Die Abmessungen der Sammelvorrichtung und damit auch ihre gesamte Sammelkapazität kann der nachfolgenden analytischen Bestimmungsmethode genau angepaßt werden, d. h. wenn durch das Verschwinden der markierten Sammelzone eine für die nachfolgende Bestimmung optimale Probenmenge gesammelt wurde, kann der Sammelvorgang abgebrochen werden und die genaue Analytbestimmung beginnen.
- i) Durch die analytkonzentrationsabhängige Probenahmezeit werden unnütze Sammelzeiten, die evtl. zu zu hohen Analytanreicherungen führen und wieder einen zusätzlichen Verdünnungsschritt vor der Bestimmung erfordern, vermieden.
- j) Bei einer stöchiometrisch konstanten Verdrängung von leichter gebundenen, entsprechend markierten Rezeptor-Partnern kann bei gefährlichen Analyten (z. B. Toxinen, Viren, Bakterien oder dergl.) auf eine zu starke Anreicherung und anschließende Eluation verzichtet werden, wenn die Markierung ein DNA/RNA-Label darstellt, das mit der bekannten PCR-Technik extrem empfindlich bestimmbar ist.

Ausführungsbeispiele der Erfindung werden in der Fig. 1a, 1b und 1c sowie Fig. 2-4 erläutert.

In Fig. 1a ist eine besonders vorteilhafte, weil einfache optische Version der Erfindung schematisch darge-

stellt. Dazu ist ein Glas- oder Quarzrohr (UV-durchlässig) 1 mit der betreffenden analyt-optimierten Sammelphase 2 unter Verwendung von zwei Fixierungselementen aus Glas- oder Quarzwolle oder entsprechenden Fritten 3 gefüllt. Bei Verwendung intensiv gefärbter geeigneter Indikationsstoffe oder Antigen-Konjugaten mit besonders großen molekularen Extinktionskoeffizienten (wie z. B. Phorphyrine, Carotinoide, Kristallviolett, etc.) kann anhand der entfärbten Zone in der Vorrichtung die jeweils noch aktuell vorhandene Sammelkapazität sofort abgelesen werden. Nach entsprechender Kalibration ist dadurch auch die Dosis zusätzlich errechenbar.

Farbige, durch die Analytmoleküle zu verdrängende Antigene erhält man aus dem Analytmolekül selbst, indem es chemisch mit bekannten, stabilen und intensiv gefärbten Farbstoffen oder chromophoren Gruppen kovalent verbunden wird. Es können aber auch dem Analyten ähnliche Moleküle mit eindeutig schwächerer Affinität zur Anreicherungsphase dazu verwendet werden. Bei einer nicht immunochemischen Analytbindung kann durch eine geeignete Wahl der chemischen Eigenschaft der chromophoren oder fluorophoren Gruppe die Lipophilie des Markierungsmoleküls (Indikations-substanz) eingestellt werden.

Aus Gründen der Empfindlichkeit sind alle bekannten, stabilen Fluoreszenzmarkierungen aus der Immuno-Assay oder Immuno-Sensor-Technik hier besonders gut geeignet. Die genaue Art spielt hier keine Rolle. Hierzu muß dann das Probenahmeröhrchen 1 mit der betreffenden, bekannten Anregungswellenlänge beleuchtet werden. Vorteilhaft ist hier eine Fluoreszenz im sichtbaren Bereich des Lichtes, da dann die analyt-beladene, nicht-fluoreszierende Zone leicht und einfach zu erkennen ist.

Die Fig. 1b zeigt ein Ausführungsbeispiel mittel einer Detektoranzeige D, die erfindungsgemäß dann angewandt werden kann, wenn die Probensammel-Vorrichtung für Licht undurchlässig ist oder wenn eine elektrochemische Markierung, wie beispielsweise Ferrocen, oder Moleküle mit einer chinoiden Struktur oder mit anderen gut zu reduzierende oder oxidierende Gruppen bzw. anderer Sensor-Markierung an das Analytmolekül gekoppelt ist. Hier ist zur Anzeige des Beladungszustandes und damit der Funktionsweise entweder an den inneren Gefäßwänden des Sammelröhrchens ein die gesamte Sammelphase überstreichendes Elektrodenarray oder ein zusätzlicher, externer Durchflußdetektor D erforderlich. Alternativ kann selbstverständlich an dieser Stelle auch ein entsprechender optischer Durchflußdetektor zur integralen Erfassung der verdrängten Markermoleküle verwendet werden.

Die Fig. 1c zeigt ein weiteres Ausführungsbeispiel mit einer weiteren Markierungsart. So können beispielsweise auch Enzyme als Marker für die zu verdrängenden Analytmolekül-Konjugat-Verbindung eingesetzt werden. Hier muß allerdings vor dem Detektor ein entsprechendes Substrat, welches von der verdrängten enzymmarkierten Verbindung in ein detektionsfähiges Produkt umgewandelt wird, zugeführt werden. Besonders geeignet, da bereits wegen ihrer Verwendung bei entsprechenden Immuno-Assays kommerziell vorhanden, sind Analytmarkierungen mit beispielsweise Glucose-oxidase (GOD) oder alkalische Peroxidase (POD) oder Phosphatase, bei denen in Gegenwart dieser Enzyme (verdrängt von der Anreicherungs- und Sammelzone) aus den zuzusetzenden Substraten Glucose, resp. Wasserstoffperoxid, resp. p-Aminobenzoylphosphat, elek-

trochemisch sehr gut anzuzeigende Verbindungen entstehen, die dem Durchschnittsfachmann geläufig sind.

Die Fig. 1d zeigt ein schematisiertes Ausführungsbeispiel für eine optimale in-situ Probenvorbereitung bei gasförmigen und flüssigen Proben. Bei gasförmigen Proben wird das zu untersuchende Gas vor dem Aufgeben auf die Sammelvorrichtung mittels eines sog. Scrubbers (Gaswäscher) von den Analyten quantitativ befreit und letzterer in eine flüssige Phase überführt. Diese flüssige Phase kann aus einer wäßrigen Pufferlösung, aber auch — je nach Stabilität der Rezeptormoleküle — auch aus einem organischen Lösungsmittel bestehen. Die die Analyte enthaltenden Flüssigkeiten werden dann durch die Sammelvorrichtung geleitet, wo eine Abtrennung und selektive Anreicherung der Analyte erfolgt.

Bei flüssigen Proben wird vorteilhafterweise dem Probenstrom durch eine immunochemische Sammelvorrichtung auch noch eine kleine Menge einer Pufferlösung mit hoher Pufferkapazität zugemischt. Der pH-Wert soll dem, bei dem eine optimale Anbindung des Analyten an die betreffende Bindungsstelle stattfindet, entsprechen.

Die Fig. 2 zeigt ein Vorrichtungsbeispiel mit kaskadenartiger Anordnung der Sammelphasenträger, die auch zur gleichzeitigen Sammlung mehrerer Analyte eine unterschiedliche Selektivität haben können.

Die Fig. 3 zeigt ein weiteres Beispiel einer Sammelvorrichtung auf Basis der Dialyseschlauch-Anordnung mit parallelen Einzelschläuchen was zu hohen Beladungskapazitäten führt.

Die Fig. 4 zeigt einen biologischen Anwendungsfall, bei dem der oder die Analyte so gefährlich sind, daß nur minimale Mengen davon gesammelt werden und jene auch in einer vor eine Spritze aufzusetzenden Kartusche mit selektiver Sammelphase verbleiben. Hier wird durch Ansaugen die Probe über diese rezeptorbeladene Phase geleitet wodurch dann eine äquivalente Menge der harmlosen Indikationssubstanz beim Zurückschieben des Spritzenkolbens für eine weitergehende Analyse freigesetzt werden. Besonders vorteilhaft ist in solchen Fällen eine Markierung mittels DNA/RNA-Labeln, da dann die PCR-Technik zur Analyse dieser Spuren eingesetzt werden kann.

Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Probenahme bei gasförmigen und flüssigen Proben zum Zwecke einer selektiven Anreicherung und Matrixabtrennung von zu bestimmenden Stoffen und/oder biologischen Systemen (Analyten) mit integrierter Dosimeter-Anzeige als Funktionsanzeige, dadurch gekennzeichnet, daß der jeweils aktuelle Beladungszustand von analyt- und/oder stoffgruppen- oder biosystem-selektiven Sammelphasen mittels Markierung durch eine Indikationssubstanz feststellbar ist, in dem in der Vorrichtung die Verdrängung der Indikationssubstanz aus spezifischen Bindungsstellen der Sammelphasen durch die zu sammelnden Stoffe/Biosysteme (Analyte) quantitativ meßbar ist, wodurch die Vorrichtung als Dosimeter und zu ihrer Funktionsüberprüfung einsetzbar ist.

2. Vorrichtung nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß in der markierten Sammelzone der Vorrichtung geometrische Formen verwirklicht sind, die eine Quantifizierung über eine Streckenskala oder ein Abzählen von Indikationssub-

stanz-freien Zonen oder Sammelböden (ohne Markierung) ermöglichen.

3. Vorrichtung nach Patentanspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die analyt-selektiven und markierten Sammelphasen auf inerte Träger immobilisiert sind, die als körniges Schüttgut mit mittleren Durchmessern im Mikrometermaßstab in lichtdurchlässigen, röhren- oder schlauchförmigen oder rechteckigen Durchström-Anordnungen einen minimalen Druckverlust ergeben und daß die durch Verdrängung der Indikationssubstanz durch Analytmoleküle entstandene markierungsfreie Zone, die gut sichtbar ist, eine schnelle und einfache, mit dem bloßen Auge feststellbare Quantifizierung ermöglicht.

4. Vorrichtung nach Patentanspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die inerten Träger für die analyt-selektiven und markierten Sammelphasen durchlässige und undurchlässige Folien sind, die entweder kaskadenartig mit großem Querschnitt hintereinander geschaltet senkrecht zu ihrer Oberfläche von der Probe durchströmt werden oder die parallel zur Oberfläche in einer aufgerollten Form, mit definierten Abstandshaltern versehen, mit der Probe beaufschlagt werden, wobei eine oder beide Träger-Oberflächen mit der Sammelphase belegt sind.

5. Vorrichtung nach Patentanspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß bei kaskadenförmiger Anordnung der inerten Träger, diese verschiedene unterschiedliche Analyte bindende Sammelmaterialeinhalten und dadurch eine Multi-Dosimeter-Anordnung ausgebildet ist.

6. Vorrichtung nach Patentanspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die inerten Träger einzeln oder gebündelt angeordnete, schlauch- oder röhrenförmige Membranen oder Kapillaren sind, wobei die Durchströmung mit der Probe beidseitig simultan oder sequentiell, d. h. erst außen vorbei und danach innen durch die Schläuche, Röhren, kapillaren oder umgekehrt, erfolgt.

7. Vorrichtung nach Patentanspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die schlauchförmigen Membranen Dialysier-Anordnungen aus dem medizinischen Bereich sind, die Sammelphasen nach den Methoden der gerichteten kovalenten Anbindung auf die Oberflächen der Dialysierschläuche immobilisiert sind und daß durch einen zusätzlichen osmotischen Gradienten über der Dialysiermembran ein gesteigerter Lösungsmittelfluß senkrecht zur Membranoberfläche erzeugbar ist, der die Analyt-Anbindungskinetik unterstützt.

8. Vorrichtung nach Patentanspruch 1 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß die markierten und selektiv analyt-bindenden Sammelphasen entweder den zu bestimmenden Stoffselektiv binden oder eine zu bestimmende Stoffklasse bzw. das zu sammelnde biologische System selektiv durch Bindung aus dem Probenstrom quantitativ entfernen.

9. Vorrichtung nach den Patentansprüchen 3 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß als markierte, analyt-bindende Sammelphase den zu sammelnden Stoffen entsprechende, selektiv wirkende Rezeptoren in einer molekularen Orientierung mit zugänglichen Bindungsstellen auf den Trägeroberflächen immobilisiert sind.

10. Vorrichtung nach Patentanspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die selektiv analyt-bindende

Rezeptoren folgende Molekül-Klassen oder Mischungen von verschiedenen, zu einer Klasse gehörenden oder verschiedenen Klassen angehörenden Rezeptoren umfassen:

- a) immunologische Antikörper oder Antikörper-Fragmente mit den zu sammelnden Stoffen oder Biosystemen als Antigen; 5
- b) komplementäre DNA/RNA zu der, die es isoliert oder gebunden zu sammeln gilt (DNA-Sonden-Prinzip); 10
- c) supra-molekulare Wirts-Gast-Verbindungen; 15
- d) durch "Molecular-Imprinting"-Technik gewonnene, selektiv die komplementäre Analyt-Molekülform-erkennende Oberflächen 15
- e) stationäre Phasen der Chromatographie; wobei bei den Molekül-Klassen a) bis c) ein nicht auf der Trägeroberfläche immobilisierter Partner aus den Proben gesammelt wird.
11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Rezeptoren mit einer schwächer als der Analyt gebundenen (assoziierten) und leicht direkt optisch (mit bloßem Auge) oder mittels einfacher interner oder externer Sensoren anzeigbaren Indikationssubstanz als Markerverbindung abgesättigt sind. 20
12. Vorrichtung nach einem der Patentansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Indikationssubstanz ein dem oder der Analytenstruktur formelmäßig oder physikalisch-chemisch ähnliches Molekül enthält, das die Eigenschaft hat, von den zu sammelnden Stoffen leicht aus der spezifischen Bindung oder Assoziation mit dem Rezeptor verdrängt zu werden und direkt optisch oder indirekt mittels interner oder externer Sensoren feststellbar ist. 25
13. Vorrichtung nach einem der Patentansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Indikationssubstanz das Analytmolekül oder die zu sammelnden Stoffe oder biochemischen Systeme selbst, modifiziert durch eine Marker-Atomgruppierung, enthält. 30
14. Vorrichtung nach einem der Patentansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen Durchflußdetektor aufweist, der über das Integral des Durchfluß-Signals von der markierten, von den Analyten verdrängten Indikationssubstanz den aktuellen Zustand der Sammelvorrichtung anzeigt und eine Summendosis angibt. 35
15. Vorrichtung nach einem der Patentansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Quantifizierung der durch die zu sammelnden Stoffe verdrängten Indikationssubstanzen mittels interner oder externer Sensoren auf optischer, massensensitiver, kalorimetrischen oder elektrochemischen Basis erfolgt. 40
16. Vorrichtung nach einem der Patentansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein zur Probenströmung paralleles, lineares Sensor-Array enthält, das auf einem angeschlossenen Rechner eine Zustands-Anzeige (Belegungsgrad) und Dosis-Quantifizierung ermöglicht. 45
17. Verfahren zur Probenahme bei gasförmigen und flüssigen Proben zum Zwecke einer Selektion Anreicherung und Matrixabtrennung mindestens eines Analyten kombiniert mit einer dosimeter-ähnlichen Quantifizierung, dadurch gekennzeichnet, daß analyt- und/oder stoffgruppen- oder biosy-

stem-selektive Sammelphasen vor jeder Probenahme mit mindestens einer stabilen und leicht feststellbaren Indikationssubstanz beladen werden, die während eines Sammelvorgangs von den zu sammelnden Stoffen/Biosystemen von der Oberfläche der Sammelphase verdrängt wird, wobei sich die Analyt-Dosis aus der Menge der analyt-verdrängten Indikationssubstanz (markierungsfreie Zone) ergibt, die durch eine Streckenmessung oder mittels eines integrierenden Detektorsignals erfaßt wird.

18. Verfahren nach Patentanspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Analyte mittels eines Elutionsmittels aus der Probenahme-Vorrichtung entfernt und einer weiteren chemischen Analyse zugeführt wegen.

19. Verfahren nach Patentanspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß bei gefährlichen (toxischen) Analyten auf eine zu große Anreicherung verzichtet wird, wozu als zu verdrängende Indikationssubstanz ein schwächer gebundener Partner des betreffenden Rezeptors, der mit einem DNA/RNA-Label versehen ist, gewählt wird und die vom Analyten freigesetzte, äquivalente Menge der so markierten Indikationssubstanz mittels der extrem empfindlichen PCR-Technik gemessen wird.

20. Verfahren nach Patentanspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß Hilfsreagenzien zur Feststellung des Ausmaßes der Markierungsverdrängung in den Proben- oder Flüssigkeitsstrom eingespeist werden.

21. Verfahren nach den Patentansprüchen 19 oder 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Vorrichtung in Form einer rezeptorgefüllten Kartusche an einer medizinischen Nadel oder Spritze positioniert wird und nach dem Ansaugen eines bestimmten Probevolumens die vor dem darin enthaltenen Analyten verdrängten DNA/RNA-gelabelten Indikationssubstanz-Moleküle in einen anderen Behälter zur weiteren PCR-basierenden Quantifizierung überspült werden.

Hierzu 7 Seite(n) Zeichnungen

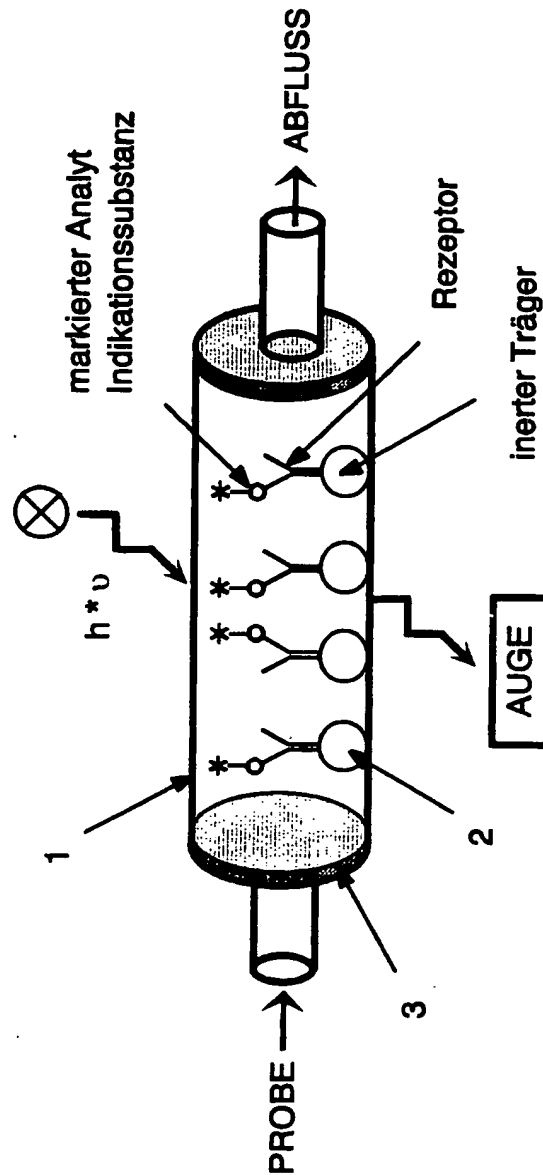
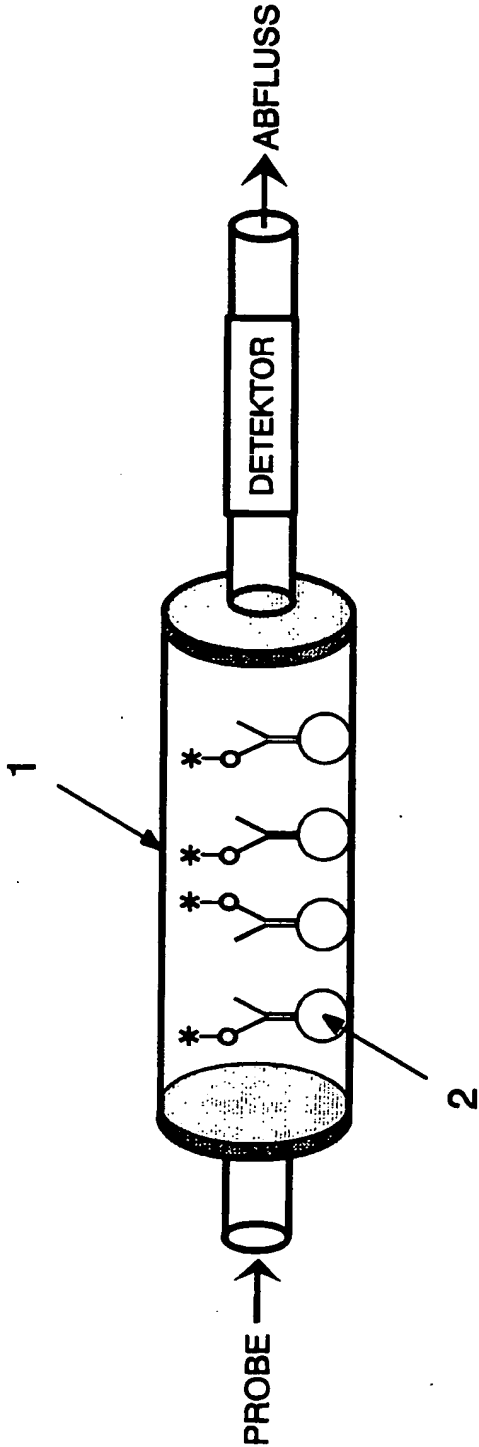


Abb. 1a

Abb. 1b



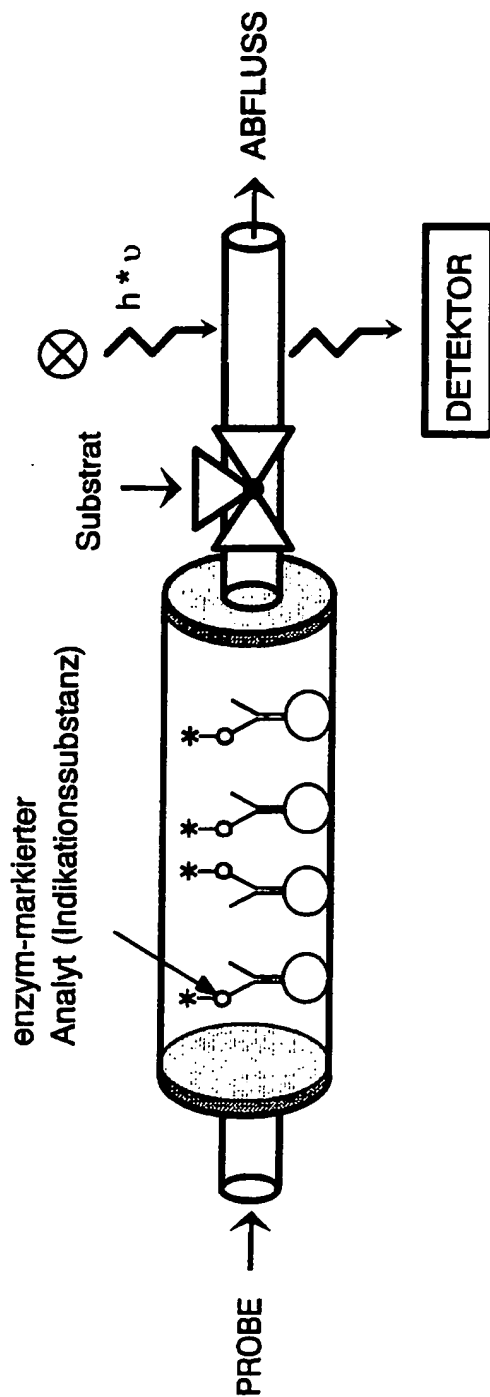


Abb. 1c

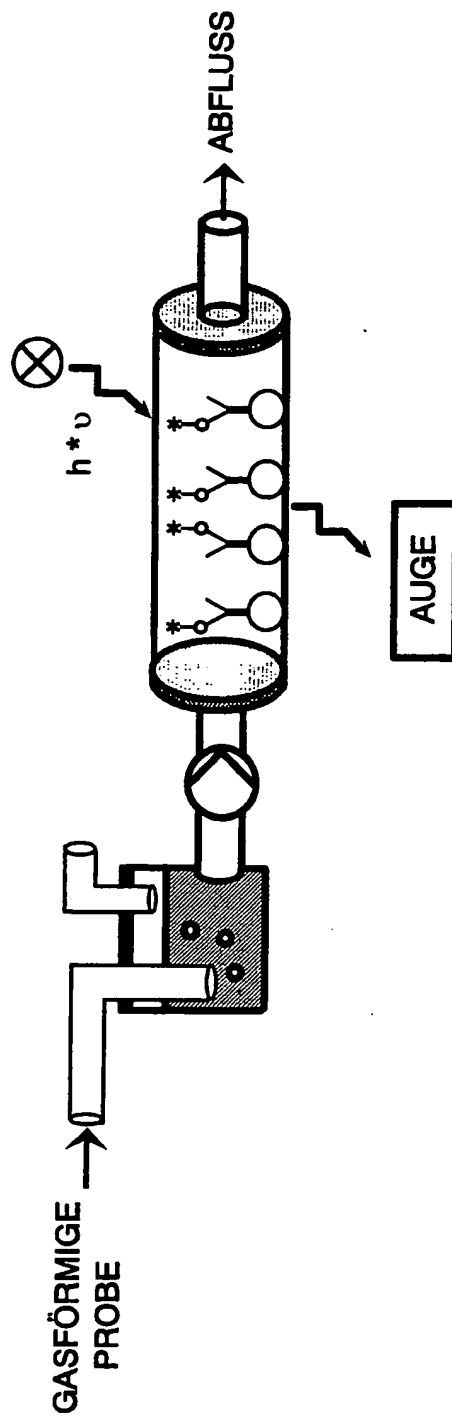


Abb. 1d

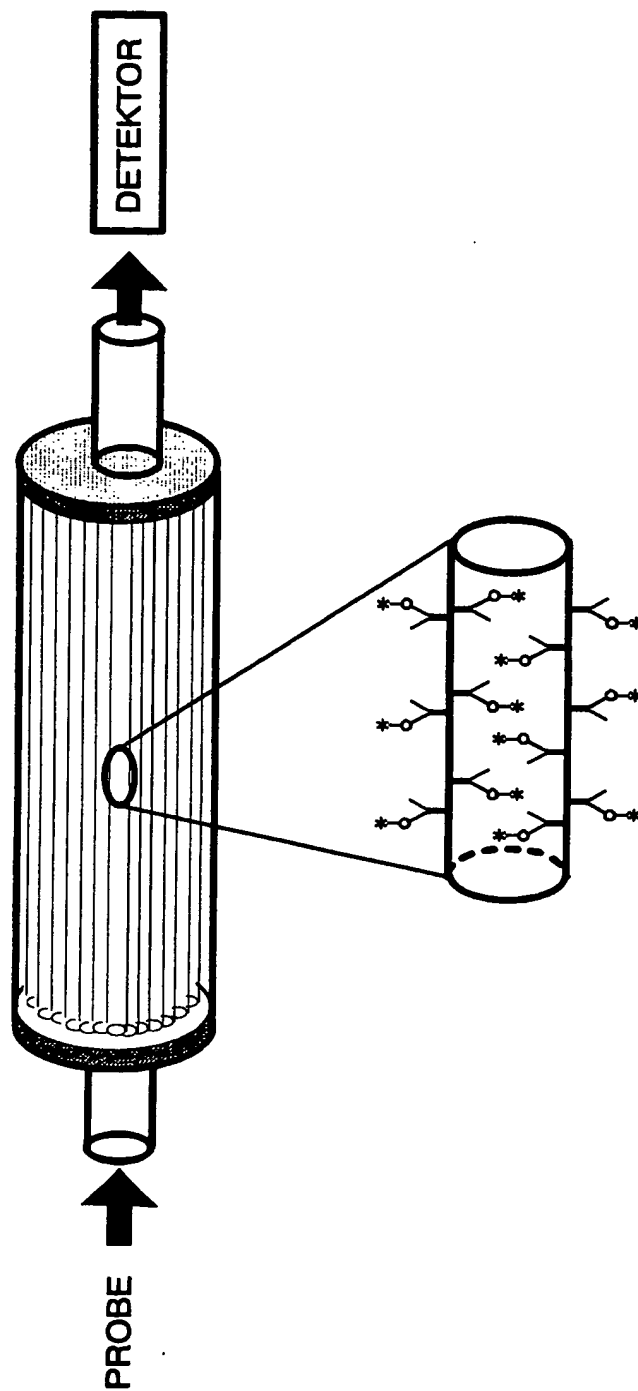


Abb.3

Abb. 2

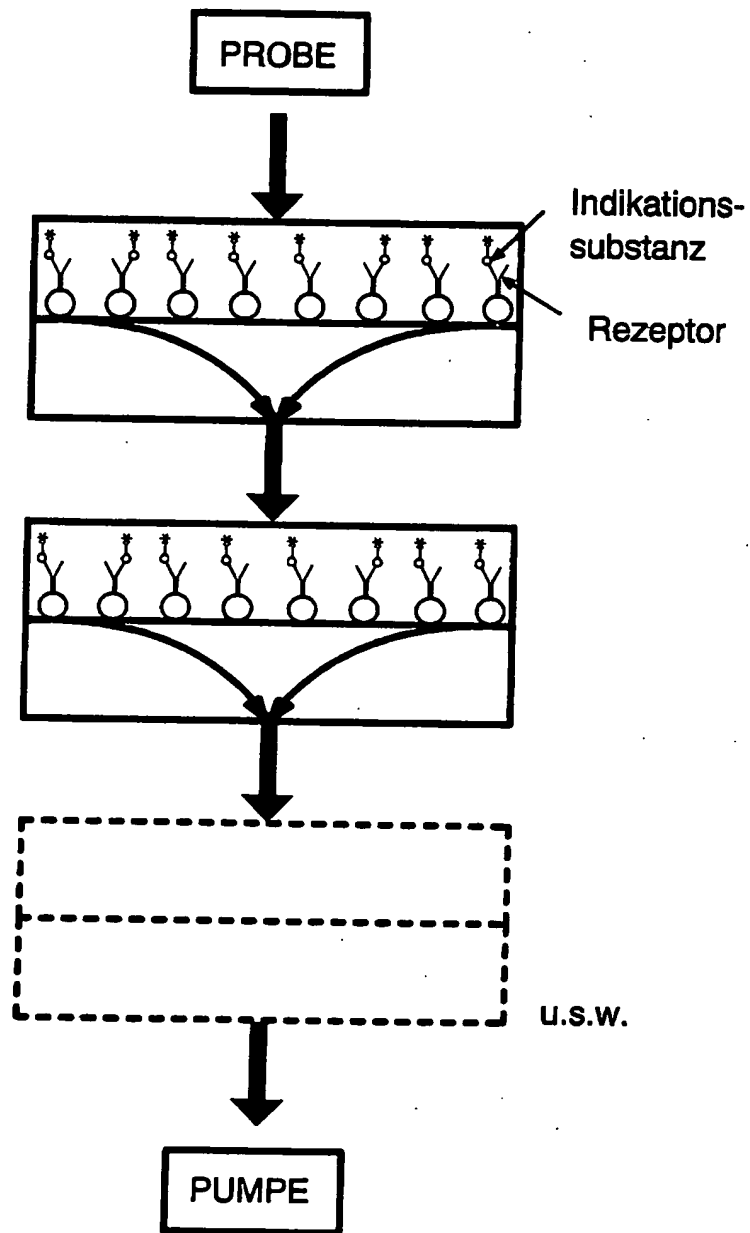
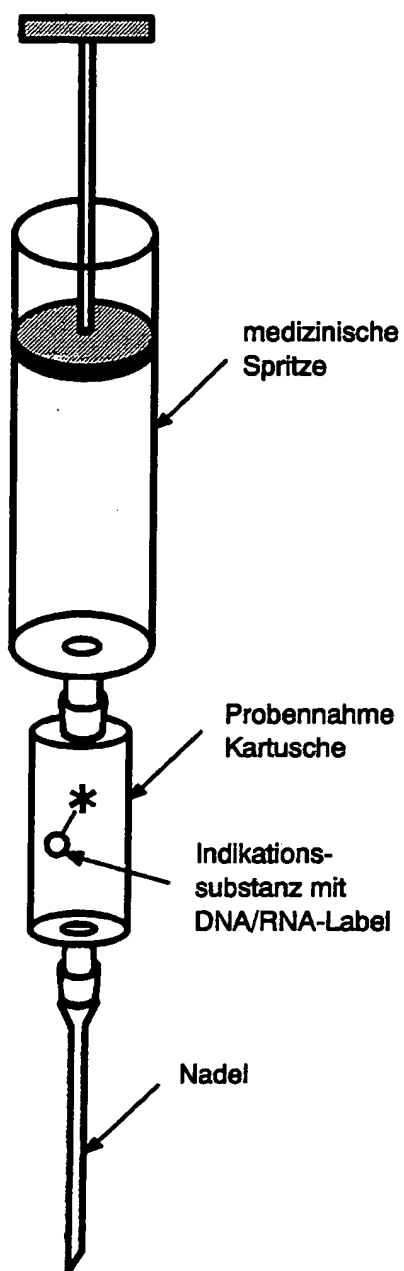


Abb. 4



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.